

# El sulfuro de hidrógeno ejerce efectos anti-catabólicos en cartílago articular artrósico in vitro.

E. F. Burguera<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Reumatología. Agrupación CICA-INIBIC. Complejo Hospitalario Universitario A Coruña. Sergas. Universidad de A Coruña, A Coruña, Spain. <sup>2</sup>CIBER-BBN/ISCIII.

A. Vela-Anero<sup>3</sup>

<sup>3</sup>Grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa. Dep. de Medicina. Universidade de A Coruña

L. Gato-Calvo<sup>1</sup>, F. J. Blanco<sup>1</sup>, R. Meijide-Failde<sup>3</sup>

**Palabras clave:** aguas mineromedicinales sulfuradas, sulfuro de hidrógeno, artrosis, cartílago.

## Resumen

El sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), compuesto activo de las aguas mineromedicinales sulfuradas, ha demostrado ser un protector tisular en varias patologías. Nuestros resultados previos demostraron que NaSH y GYY4137, dos compuestos sintéticos que producen H<sub>2</sub>S, presentan efectos anti-inflamatorios y anti-catabólicos en condrocitos procedentes de pacientes con artrosis (OA) estimulados con interleuquina 1β (IL1β). En el presente trabajo se investigó si estos mismos compuestos inhiben también los procesos catabólicos directamente en cartílago humano artrósico.

## 1 Introducción

### 1.1 La artrosis (OA)

La artrosis (osteoarthritis, OA) es la artropatía más frecuente en la población, además de ser una de las enfermedades reumáticas más dolorosas. Más del 70% de las personas mayores de 50 años tiene signos radiológicos de OA en alguna articulación. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la OA se encuentra entre las cuatro primeras enfermedades que reducen los años de vida, ajustados por calidad. En España, la OA de rodilla y cadera tienen una elevada prevalencia, del 10,2% y 4% respectivamente.

La Sociedad Española de Reumatología (SER) calcula que el tratamiento de estas patologías supone en España un coste anual superior a 4.738 millones de euros, equivalente al 0,5% del producto interior bruto (PIB) [1,2]. Aunque la OA es una enfermedad en la que participa la articulación afectada al completo, el aspecto más característico es la destrucción progresiva del cartílago articular. El cartílago articular es un tejido conectivo especializado, compuesto por matriz extracelular

(MEC) y por un reducido número de células, los condrocitos. Estas células son las responsables de la síntesis y mantenimiento de la matriz y representan menos del 1-2% del volumen total del cartílago. La MEC está compuesta fundamentalmente por agua y el resto (20-30%) son proteínas. De éstas, las más abundantes son el colágeno de tipo II y los proteoglicanos. En la MEC, las fibrillas de colágeno forman un entramado tridimensional a modo de mallas, orientado para descargar las fuerzas de tracción y proporcionar así resistencia a la tensión. Se ha sugerido que el colágeno tipo IX, que contiene una cadena de condroitín sulfato, actúa como intermediario entre las fibras de colágeno tipo II y los proteoglicanos, contribuyendo de esta manera a aumentar esa estabilidad estructural de la MEC [3]. Los proteoglicanos son macromoléculas sintetizadas por los condrocitos, constituidas por una proteína central a la que se unen, de forma covalente, un tipo polisacáridos, denominados glucosaminoglicanos (GAGs). Entre estos encontramos ácido hialurónico, condroitín sulfato (*Ch-S*), dermatán sulfato, heparán sulfato y queratán sulfato (*KS*). Los más abundantes en el cartílago son el condroitín-4-sulfato, el condroitín-6-sulfato, el dermatán sulfato y el *KS*. El ácido hialurónico (*HA*), único GAG que no está sulfatado, tiene la función de enlazar entre sí los diversos proteoglicanos formando voluminosos agregados que ocupan los espacios entre las redes de fibrillas de colágeno.

El agregano es el proteoglicano más abundante en el cartílago. Esta proteína ayuda a resistir las fuerzas de compresión en el cartílago. Los GAGs que lo forman son fundamentalmente el *Ch-S* y el *KS*.

Actualmente, la síntesis y degradación del agregano, al igual que la del colágeno II, son objeto de estudio por su participación en el deterioro del cartílago durante la OA. Ambos son dos de los marcadores más importantes debido a las diferencias

existentes entre el cartílago normal y el OA, en el que se encuentran muy disminuidos.

La degeneración del cartílago articular es el episodio clave en el desarrollo de la OA y tiene una etiología multifactorial. Entre los factores involucrados en su destrucción destacan los factores mecánicos y los mediadores biológicos. Debido a estos efectos (mecánicos y biológicos), se ha demostrado que el cartílago OA es hipocelular (debido a un aumento de muerte celular por apoptosis), está sometido a un aumento de estrés oxidativo y presenta una elevación de marcadores inflamatorios y catabólicos. Esto, a la postre, conduce a un desequilibrio entre los mecanismos de reparación y destrucción del tejido, dando lugar a su destrucción progresiva.

En concreto, en una articulación con OA se pueden encontrar cantidades elevadas de mediadores inflamatorios sintetizados por los condrocitos. La IL-1 $\beta$  es la molécula pro-inflamatoria por excelencia en el proceso OA. Es capaz de estimular su propia síntesis, la de otras interleuquinas pro-inflamatorias como la IL-6 y la IL-8, la de especies reactivas de oxígeno (anión superóxido, O $_2^{\cdot-}$ ), de nitrógeno (óxido nítrico, NO) y de la prostaglandina E2 (PGE2), además de MMPs, colagenasas y agreganasas. La IL-1 $\beta$  es también responsable de la inhibición de la síntesis de colágeno II y de agregano en los condrocitos [4-6]. Desde un punto de vista catabólico, el elemento más importante en la degradación del cartílago articular son las proteasas siendo las más destacadas las MMPs. Estas proteínas son endopeptidasas capaces de degradar diferentes sustratos como colágenos, proteoglicanos, gelatina o fibronectina [7]. En condiciones normales estas proteínas, se encuentran en muy baja cantidad en el cartílago adulto, sin embargo sus niveles se elevan significativamente en la OA [8].

## 1.2 Tratamientos actuales para la OA

Actualmente, el tratamiento de la OA es multidireccional y principalmente sintomático. No existe un tratamiento definitivo en ninguno de sus múltiples ámbitos, ni farmacológico, ni físico, ni con medicina alternativa, que cure o cuando menos detenga la progresión de la enfermedad. Las personas que la padecen ligan su vida a una serie de pautas, como la pérdida de peso para aliviar los factores mecánicos, el manejo de terapia física supervisada, y la aplicación de terapia farmacológica analgésica y anti-inflamatoria. Entre esta última, se incluye el uso de anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs), con una buena efectividad pero nocivos efectos adversos, los fármacos de acción lenta (*symptomatic slow*

*action drugs for osteoarthritis, SySADOA*) y la terapia intra-articular, todos ellos con una eficacia inconsistente. Recientemente también se han aprobado y se están utilizando algunos agentes de acción central y terapia biológica, sin embargo, en ambos casos, si bien la eficacia es buena, los efectos adversos son mayores de lo esperado [9]. En general, cuando la OA es severa y el paciente supera los 60 años el tratamiento más usado es el reemplazamiento de la articulación por una prótesis mediante artroplastia.

Un tratamiento actualmente en exploración es la balneoterapia, y más concretamente, el uso de aguas sulfuradas. El uso de aguas mineromedicinales como tratamiento complementario no farmacológico en las enfermedades reumáticas tiene una gran tradición en España.

La Comunidad de Galicia es rica en estos recursos, de hecho Galicia cuenta con como mínimo 21 balnearios registrados por la Consellería de Economía e Industria y la mayoría de las emanaciones son aguas bicarbonatadas y sulfuradas. En los últimos años se han realizado algunos estudios con resultados positivos en la mejoría de la sintomatología de la OA con balneoterapia [10-15], y centrándonos en los estudios realizados únicamente con aguas sulfuradas tanto en balneoterapia, peloterapia, como en agua bebida en pacientes con OA revelan que estas aguas aumentan los niveles de H $_2$ S en plasma tras los tres tipos de tratamientos en conjunto [16] y que en general tienen un efecto anti-oxidante [16-18], mejoran la movilidad y la calidad de vida de los pacientes [19]. Una revisión Cochrane, realizada por Verhagen en 2007 [20], resuelve que los datos obtenidos hasta el momento aunque no son concluyentes indican que este tratamiento podría ser efectivo. Es más, las últimas recomendaciones de la *Osteoarthritis Research Society International (OARSI)* para el tratamiento no quirúrgico de la artrosis de rodilla, incluyen como tratamiento apropiado para pacientes con OA en más de una localización y con comorbilidades, las aguas termales, incluidas las sulfuradas, [21].

Sin embargo, a pesar de su gran popularidad y de los estudios observacionales con resultados positivos, los estudios científicos sobre los mecanismos biológicos subyacentes son escasos.

## 1.3 El sulfuro de hidrógeno (H $_2$ S)

El sulfuro de hidrógeno (H $_2$ S) es el principio activo de las aguas mineromedicinales sulfuradas. Es un gas conocido por su olor característico a huevos podridos y que, hasta mediados de los 90, se consideraba principalmente tóxico para el ser

humano y dañino para el medio ambiente. Sus mecanismos de acción fueron completamente desconocidos hasta las últimas décadas del siglo XX [22-24].

Sin embargo, a finales de siglo, se descubrió que el H<sub>2</sub>S es un gas producido de forma endógena en los tejidos. Al igual que el NO y el monóxido de carbono (CO), el H<sub>2</sub>S ha sido recientemente identificado como una molécula de señalización gaseosa, un mediador endógeno de la inflamación [25] y como un potencial compuesto citoprotector [26]. El H<sub>2</sub>S es altamente lipofílico por lo que atraviesa con facilidad las membranas celulares y es capaz de llegar a la mayoría de los tejidos del organismo lo que le confiere un alto potencial biológico.

A nivel endógeno, el H<sub>2</sub>S se sintetiza a través de una vía enzimática fundamentalmente mediante tres enzimas, la cistationina beta sintasa (CBS, EC 4.2.1.22), la cistationina gamma liasa (CTH, EC 4.4.1.1) y en menor medida por la mercaptopiruvato azufre transferasa (MPST, EC 2.8.1.2) [27]. El sustrato de estas enzimas es un aminoácido, la L-cisteína, que se encuentra tanto en alimentos como en otras proteínas y que también puede ser sintetizado a través de la L-metionina. CBS es la enzima predominante en cuanto a la producción de H<sub>2</sub>S en el cerebro y sistema nervioso [27]. La CTH es característica del sistema vascular y de su músculo liso [28,29]. La tercera enzima mencionada, MPST, a diferencia de las otras dos que están únicamente en el citosol, se encuentra tanto en el citosol como en las mitocondrias [30].

#### 1.4 Estudios del sulfuro de hidrógeno en las enfermedades reumáticas

También se han publicado recientemente algunos estudios sobre los efectos de la adición exógena de H<sub>2</sub>S con compuestos sintéticos en modelos *in vitro* o *in vivo* de enfermedades reumáticas, incluyendo la OA. En 2013 Li *et al.* [31], cuyos estudios previos habían descrito un efecto inflamatorio del H<sub>2</sub>S, utilizan otro compuesto liberador de H<sub>2</sub>S, el (p-methoxyphenyl) morpholino-phosphinodithioic acid (GYY4137) en sinoviocitos y condrocitos humanos, y en un modelo animal de OA en ratas. En el estudio *in vitro* concluyen que el H<sub>2</sub>S tiene un efecto anti-inflamatorio inhibiendo NO, PGE<sub>2</sub>, TNF $\alpha$ , IL-6, iNOS y COX-2 y que uno de los blancos probables de actuación del mismo es la inhibición de NF $\kappa$ B. En *in vivo*, sus estudios llegan a la misma conclusión, cuando GYY4137 se administra de forma terapéutica, una vez establecida la inflamación.

En nuestros estudios previos, se utilizó un modelo *in vitro* con condrocitos articulares procedentes de

tejido de pacientes con OA y se encontró que la adición de H<sub>2</sub>S a estas células, cuando se han estimulado con IL1 $\beta$ , resultó beneficioso. Se observaron efectos anti-inflamatorios (reducción de los niveles de IL-6 y PGE2 (y sus enzimas de producción)), efectos anti-catabólicos (reducción de la expresión génica y la abundancia de MMP3 y MMP13) [32], FERP) y efectos antioxidantes (reducción de ROS y de especies reactivas de nitrógeno) en las células OA [33].

## 2 Objetivos

El objetivo principal de este trabajo fue investigar los efectos anti-catabólicos y/o pro-anabólicos del H<sub>2</sub>S, suministrado exógenamente con dos compuestos sintéticos (NaSH y GYY4137), en un modelo *in vitro* con cartílago articular humano artrósico estimulado con IL-1 $\beta$ .

## 3 Métodos

### 3.1 Consideraciones éticas

Este proyecto fue evaluado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (CEIC). Las muestras biológicas y los datos clínicos que se utilizaron en este proyecto son de los participantes en la colección de muestras para la investigación en enfermedades reumáticas creada bajo la responsabilidad del Dr. Francisco Javier Blanco García, debidamente registrada en el Registro Nacional de Biobancos con código C.0000424 y autorizada por el CEIC de Galicia con código 2013/107. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado según la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y se garantizó la confidencialidad de sus datos personales, de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

### 3.2 Obtención de cartílago articular

Los explantes de cartílago articular se obtuvieron de pacientes sometidos a operaciones de reemplazo articular ocasionadas por artrosis realizadas en el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC). El cartílago se obtuvo mediante resección con bisturí, primero formando láminas gruesas y posteriormente cortando piezas cilíndricas con un disco de biopsia de 6 mm de diámetro.

### 3.3 Modelo de cultivo *in vitro*

Para estudiar si los compuestos de sulfuro podían ejercer efectos protectores en la MEC del cartílago, se realizaron experimentos en los que los discos se estimularon con una concentración de 5 ng/ml de IL-1 $\beta$  en el medio de cultivo, para reproducir *in vitro* las condiciones de la OA en su fase aguda, y con dos concentraciones (200 y 1000  $\mu$ M) de NaSH o GYY4137, para intentar contrarrestar los efectos negativos inducidos por la IL-1 $\beta$ . Los discos de cartílago se mantuvieron en estas condiciones durante 21 días. Los días 3, 7, 10, 14 y 21 de cada experimento se retiraron y congelaron los sobrenadantes, para analizarlos posteriormente, y se renovaron los medios con los estímulos. Estos experimentos se realizaron con cartílago de 4 donantes OA. Al terminar cada experimento se recuperaron los explantes de cartílago. Cada disco se dividió en dos y una mitad se utilizó para realizar tinciones histoquímicas e inmunohistoquímicas tras su inclusión en parafina y la otra para la cuantificación de GAGs. Cada mitad de tejido utilizado para este protocolo se pesó en húmedo y los resultados se expresaron en  $\mu$ g de GAG/mg de peso húmedo. El tejido se deshidrató completamente en una *SpeedVac* y se realizó una digestión con 1 ml de disolución de papaína durante 18 h.

### 3.4 Cuantificación de GAGs

La cuantificación de GAGs se realizó, tanto en los sobrenadantes como en los explantes de cartílago, mediante el kit comercial *Blyscan sulfated glycosaminoglycan assay* que se basa en la formación de complejos entre los GAGs y el reactivo de color 1,9-azul de dimetilmetileno. Los resultados se compararon con una curva de calibrado preparada con una concentración conocida de un estándar de GAGs. Para analizar los resultados se consideró que la suma de la cantidad de GAGs en tejido y la cantidad de GAGs en los sobrenadantes, para cada condición, suponía el 100% de la cantidad de GAGs y se transformaron los resultados a % de GAGs retenido en el tejido y % de GAGs liberado al sobrenadante.

### 3.5 Tinciones histoquímicas e inmunohistoquímicas

Para los distintos estudios histoquímicos e inmunohistoquímicos, los discos de cartílago se fijaron en paraformaldehído 3,7-4% durante 24 h, se deshidrataron con alcoholes de graduaciones crecientes (70°, 96° y absoluto) y se incluyeron en parafina. Para realizar las tinciones se obtuvieron

secciones de 4  $\mu$ m con un microtomo, se desparafinaron (10 min en estufa, 37°C), se aclararon con xilol (10 min) y se rehidrataron en una secuencia de alcoholes decrecientes (absoluto, 10 min; 96°, 10 min y 70°, 10 min), seguido de 10 min en agua destilada. Una vez que las secciones estuvieron rehidratadas se procedió con los protocolos de las distintas tinciones: a) Hematoxilina-eosina (permite observar los núcleos celulares, que se tiñen de azul, y los citoplasmas, de rosa); b) Tricrómico de Masson (TM, tiñe las fibras de colágeno que adquieren un color azul intenso, el tejido conjuntivo verde, los núcleos se tiñen de azul-negro y el citoplasma de rosa); c) Safranina O (S-O, indica la presencia de glucosaminoglicanos sulfatados, tales como el ChS o KS, haciendo que la muestra adquiera mayor o menor intensidad de rojo en función de la cantidad de GAGs presentes; d) Azul de toluidina (AT, es un colorante metacromático que cambia su color azul por un color rojizo al reaccionar con los proteoglicanos, sin embargo, los núcleos y los citoplasmas adquieren la propia tonalidad del colorante, resultando azules. En las secciones de cartílago también se realizaron inmunohistoquímicas (IHQ) para la detección de la abundancia de determinadas proteínas (Col II, agregano, KS, ChS, MMP3 y MMP13) en el tejido utilizando anticuerpos monoclonales específicos.

## 4 Resultados

### 4.1 Efectos sobre la pérdida de GAGs en cartílago estimulado con IL-1 $\beta$

Al analizar los resultados obtenidos con el kit de cuantificación de GAGs en tejido y sobrenadantes, se pudo observar que:

- En condiciones basales, la cantidad de GAGs que permanece en el tejido OA tras 21 días es aproximadamente de un 80% - 85% mientras que un 15% - 20% se pierden al sobrenadante.

- La exposición durante 21 días a la IL-1 $\beta$  supone en el tejido OA un relevante descenso de la cantidad de GAGs en el cartílago y un aumento de su pérdida hacia el sobrenadante. De hecho la cantidad de GAGs perdida al sobrenadante fue superior a la que permanece en el tejido.

- La co-estimulación con los compuestos liberadores de sulfuro, supone una mejoría en todos los casos, aumentando la cantidad de GAGs retenida en el tejido y protegiendo o inhibiendo su pérdida hacia el sobrenadante. Las dosis más efectivas fueron 200  $\mu$ M NaSH y 1000  $\mu$ M GYY4137.

## 4.2 Efectos sobre el estado de la matriz extracelular del cartílago estimulado IL-1 $\beta$ . Análisis histoquímico e inmunohistoquímico

### Tinciones histoquímicas

#### *Safranina O*

En la tinción para GAGs en tejido *OA* se observó que los discos estimulados con IL-1 $\beta$  sufrieron una pérdida de GAGs pronunciada, aunque con diferencias entre los diferentes donantes. También es llamativo que en la condición basal se observó que la región interterritorial, que rodea a los condrocitos, fue más positiva que el resto de la matriz (indicando síntesis activa de estas proteínas), mientras que en los discos estimulados con IL-1 $\beta$  esta positividad se había perdido. Se observó que las dosis de GYY4137 utilizadas protegieron al tejido de la pérdida de GAGs ocasionada por la estimulación con IL-1 $\beta$ , mientras que en el caso de NaSH solamente la concentración más elevada ejerció este efecto.

#### *Azul de toluidina*

En la tinción para componentes metacromáticos, entre los que se encuentra principalmente el ácido hialurónico, no se observaron grandes diferencias a nivel de la capa superficial y, tanto el efecto de la IL-1 $\beta$  como el de los compuestos de sulfuro eran más evidentes a nivel de la capa profunda del cartílago. En el tejido *OA*, la condición con IL-1 $\beta$  presenta una pérdida de tinción bastante pronunciada. Este proceso mejora con ambos compuestos de H<sub>2</sub>S y la concentración de 200  $\mu$ M ya es totalmente efectiva para ambos. En esta tinción, la región interterritorial prácticamente pierde su positividad en la condición con IL-1 $\beta$  y se vio como además los condrocitos dejan de ser positivos, mientras que con NaSH y GYY4137, y ya a 200  $\mu$ M estas dos regiones son muy positivas.

#### *Tricrómico de Masson*

Con la tinción tricrómico de Masson se observaron muy pocas diferencias entre las distintas condiciones ensayadas. Esta tinción refleja el contenido de colágenos en las muestras. En general, el cartílago *OA* tras 21 días de estimulación con IL-1 $\beta$  es sólo ligeramente menos positivo que la condición sin estimular, y la adición de las diferentes concentraciones de NaSH y GYY4137 parece evitar esa ligera pérdida.

### Tinciones inmunohistoquímicas

#### *Queratán – sulfato*

En la inmunohistoquímica para queratán-sulfato (*KS*) en tejido *OA* indicó para la condición con IL-1 $\beta$  una

pérdida de este GAG en todas las muestras. Para todos los casos, la co-estimulación de IL-1 $\beta$  con NaSH supuso una mejoría relevante y lo mismo ocurrió con GYY4137, y para ambos compuestos parece que la mejor concentración fue la más elevada.

#### *Condroitín sulfato*

En la inmunohistoquímica para *Ch-S* en tejido *OA* se observó una pérdida importante en la condición con IL-1 $\beta$ . Las diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>S aumentaron los niveles de *Ch-S* de la matriz. Además, para ambos compuestos el efecto beneficioso fue dosis dependiente.

#### *Metalloproteinasas 3 y 13*

También se analizaron ambas *MMPs* en los discos de cartílago. Ambas *MMPs* presentaron una baja positividad en la condición basal. En el caso de la *MMP3*, la IL-1 $\beta$  indujo la síntesis por parte de los condrocitos, ya que se observó una fuerte positividad en el interior de los mismos. La adición de NaSH y GYY4137 produjo una reducción de esta positividad, aunque GYY4137 parece ser más efectivo. En cuanto a *MMP13*, la positividad fue mucho más intensa tras 21 días en cultivo con IL-1 $\beta$ . La estimulación con los compuestos de sulfuro disminuyó la síntesis de esta *MMP*, sin embargo, sólo en 1000  $\mu$ M de ambos compuestos se vio desaparecer la positividad del tejido en el interior de los condrocitos.

#### *Agrecano y colágeno II*

También se analizó la presencia de estas proteínas en los discos de cartílago. Tanto en el caso del colágeno II, como del agrecano se observó que la IL-1 $\beta$  indujo una reducción en la matriz del cartílago, sin embargo esta reducción no se produce, e inclusive los condrocitos sintetizan mayores cantidades, en presencia de ambos compuestos de sulfuro. También es destacable que la administración de la IL-1 $\beta$  parece no sólo degradar el col II y el agrecano en la matriz, si no también inhibir su producción en las células, como se dedujo de la falta de coloración intracelular. La administración conjunta de NaSH o GYY4137 con IL-1 $\beta$  también mejora este aspecto, puesto que las imágenes de estas condiciones sí revelaron tinción intracelular.

## 5 Discusión

La patogénesis de la *OA* está causada, al menos en parte, por un desequilibrio entre la síntesis y la degradación en la matriz del cartílago. Las proteasas son las principales responsables de la degradación del cartílago y se ha demostrado que la predisposición catabólica comienza con un incremento de las agrecanasas seguido de un aumento en las *MMPs* [34,35]. La collagenasa 3

(*MMP13*) es la enzima más relevante en cuanto a la degradación de colágeno tipo II se refiere. Está regulada por el estrés en general – y la inflamación en particular – y por señales de la inducción a la diferenciación. Una revisión publicada recientemente [36] ha señalado a la *MMP13* como el gen clave en el que convergen algunos factores de las vías de señalización que participan en las diferentes etapas de la *OA*. En nuestro estudio las IHQ para *MMP13* y *MMP3* mostraron un incremento importante con la estimulación con IL-1 $\beta$  y una reducción con la coestimulación con los compuestos de sulfuro, sobre todo con la dosis mayor de GYY4137. Ésta consiguió preservar la matriz en un estado muy similar al basal. Y es más, para la *MMP3*, con 200  $\mu$ M GYY4137 fue suficiente. No hay, que tengamos conocimiento, ningún otro estudio que relacione el efecto del NaSH o el GYY4137 con la actividad de la *MMP13* en condrocitos *OA* humanos. Sin embargo, sí que hay varios estudios que observan un efecto parecido en condrocitos utilizando el *DAS*, un compuesto organosulfurado extraído del ajo [37-39]. Por añadidura, en nuestros estudios también encontramos que este descenso de la *MMP13* se puede relacionar con un aumento en la síntesis de colágeno tipo II y agregano, comprobando que las mismas concentraciones que disminuyen la *MMP13* son las que hacen que estos aumenten en el tejido (IHQs).

Estos efectos también se observaron y se cuantificaron en las distintas tinciones de los componentes de la MEC realizadas en el tejido a los 21 días. Por ejemplo, las tinciones de S-O, junto con las IHQ de *KS* y *Ch-S* por un lado, y la tinción de AT por el otro, corroboran que los compuestos de sulfuro son eficaces para prevenir la pérdida de GAGs sulfatados y no sulfatados, respectivamente. También en la IHQ de agregano se observó como los compuestos de sulfuro preservan su presencia, frente a la depleción ocasionada por la IL-1 $\beta$ .

Además de los efectos protectores del H<sub>2</sub>S frente a la inducción del fenotipo catabólico ocasionada por la IL1 $\beta$  que acabamos de discutir, se observó también que estos compuestos parecen inducir efectos pro-anabólicos. No hay hasta la fecha ninguna publicación de la que tengamos conocimiento que analice el efecto del H<sub>2</sub>S sobre el anabolismo celular en cartílago. Estrictamente hablando, en nuestro estudio no podemos diferenciar si el H<sub>2</sub>S está simplemente protegiendo la matriz de la degradación o bien está induciendo la síntesis de los GAGs por parte de los condrocitos. Sin embargo, el análisis de las tinciones y las IHQ de estos tejidos, centrado en las células y su región interterritorial, parecen sugerir que sucede lo segundo. Tanto al visualizar los GAGs

mediante la tinción S-O, como los más representativos por separado (ácido hialurónico (AT), *KS* y *Ch-S*), así como las IHQ de col II y agregano, podemos comprobar que, por norma general, en las condiciones con IL-1 $\beta$  se pierde la positividad en el interior de los condrocitos y en la región interterritorial. Mientras que cuando el tejido se estimuló también con NaSH o GYY4137, principalmente a las dosis más altas, se apreció una positividad intracondrocitaria e interterritorial. Estos resultados nos llevan a la conclusión de que los compuestos de H<sub>2</sub>S no sólo protegen al tejido frente a la acción catabólica potenciada por la IL-1 $\beta$ , si no que estimulan la síntesis de GAGs, agregano y colágeno tipo II en las células.

En cuanto al contenido de colágeno, la tinción de tricrómico de Masson ha sido poco esclarecedora. En general, nuestros resultados a nivel histoquímico no reseñan apenas diferencias en el contenido de colágeno entre la condición basal, la estimulada con IL-1 $\beta$  o las condiciones con H<sub>2</sub>S. Sin embargo, en la IHQ de col II sí que se observó una pérdida importante de positividad debido a la IL-1 $\beta$  y una recuperación con ambos compuesto de sulfuro. Por lo tanto, en el peor de los casos estos compuestos son capaces de prevenir la pérdida de colágeno y preservar la síntesis en las células.

## 6 Conclusiones

En general, por los datos que aportan nuestros estudios podemos afirmar que, como mínimo, el H<sub>2</sub>S es un buen protector frente a la degradación del cartílago y que además parece prevenir el cambio hacia el fenotipo catabólico en los condrocitos, mejorando su capacidad de síntesis de proteoglicanos y GAGs. Las concentraciones más elevadas de los compuestos de sulfuro son las más eficaces.

## Agradecimientos

AVA y EFB le agradecen a la Diputación de A Coruña y al CIBER-BBN la financiación para este trabajo. CIBER-BBN es una iniciativa del ISCIII. LCG disfruta de una beca FPU del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Agradecemos a los pacientes de los Servicios de Reumatología y Traumatología del CHUAC que donaron tejido para este estudio.

## Referencias

- [1] López-Armada MJ, Blanco García FJ. Fisiopatología de la artrosis. In: E. Batlle-Gualda, P. Benito Ruiz, F.J. Blanco García, E.



- Martín Mola, editor. Manual S.E.R de la artrosis; 2002. p. 77.
- [2] H Kotlarz, CL Gunnarsson, H Fang, JA Rizzo. Insurer and out-of-pocket costs of osteoarthritis in the US: evidence from national survey data. *Arthritis Rheum* 60(12):3546, 2009.
  - [3] Eyre DR, Weis MA, Wu J. Articular cartilage collagen: An irreplaceable framework? *European Cells & Materials* 12:57-63, 2006
  - [4] Monfort Faure J, Benito-Ruiz P, Blanco garcia F, Tornero Molina J, Möller Parera I, Batlee-Gualda E. Artrosis: Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. Madrid: Panamericana; 2010.
  - [5] Inoue K, Masuko-Hongo K, Okamoto M, Nishioka K. Induction of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) by interleukin-1 in human articular chondrocytes and synoviocytes. *Rheumatol Int* 26 (2):93-98, 2005.
  - [6] Stove J, Huch K, Gunther KP, Scharf HP. Interleukin-1beta induces different gene expression of stromelysin, aggrecan and tumor-necrosis-factor-stimulated gene 6 in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Pathobiology* 68(3):144-149, 2000.
  - [7] Monfort J, Tardif G, Reboul P, Mineau F, Roughley P, Pelletier J, et al. Degradation of small leucine-rich repeat proteoglycans by matrix metalloprotease 13 - identification of a new biglycan cleavage site (vol 8, R26, 2012). *Arthritis Research & Therapy* 15 (2):401, 2013.
  - [8] Woessner JF,Jr, Gunja-Smith Z. Role of metalloproteinases in human osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* 27:99-101, 1991.
  - [9] Hochberg MC. Osteoarthritis year 2012 in review: clinical. *Osteoarthritis Cartilage* 20 (12):1465-1469, 2012.
  - [10] Cantarini L, Leo G, Giannitti C, Cevenini G, Barberini P, Fioravanti A. Therapeutic effect of spa therapy and short-wave therapy in knee osteoarthritis: a randomized, single blind, controlled trial. *Rheumatol Int* 27 (6):523-529, 2007.
  - [11] Alp A, Yurtkuran M, IlCol YO. Effects of balneotherapy on serum interleukin-2 receptors, inflammation markers and cortisol levels in knee osteoarthritis. *Physikalische Medizin Rehabilitationsmedizin Kurortmedizin* 17 (4):215-219, 2007.
  - [12] Bagnato G, De Filippis LG, Morgante S, Morgante ML, Farina G, Caliri A, et al. Clinical improvement and serum amino acid levels after mud-bath therapy. *Int J Clin Pharmacol Res* 24 (2-3):39-47, 2004.
  - [13] Balint GP, Buchanan WW, Adam A, Ratko I, Poor L, Balint PV, et al. The effect of the thermal mineral water of Nagybaracska on patients with knee joint osteoarthritis - a double blind study. *Clin Rheumatol* 26 (6):890-894, 2007.
  - [14] Bellometti S, Gallotti C, Pacileo G, Rota A, Tenconi MT. Evaluation of outcomes in SPA-treated osteoarthrotic patients. *Journal of preventive medicine and hygiene* 48 (1):1-4, 2007.
  - [15] Fioravanti A, Collodel G, Petraglia A, Nerucci F, Moretti E, Galeazzi M. Effect of hydrostatic pressure of various magnitudes on osteoarthritic chondrocytes exposed to IL-1 beta. *Indian J Med Res* 132 (2):209-217, 2010.
  - [16] Benedetti S, Canino C, Tonti G, Medda V, Calcaterra P, Nappi G, et al. Biomarkers of oxidation, inflammation and cartilage degradation in osteoarthritis patients undergoing sulfur-based spa therapies. *Clin Biochem* 43 (12):973-978, 2010.
  - [17] Costantino M, Giuberti G, Caraglia M, Lombardi A, Misso G, Abbruzzese A, et al. Possible antioxidant role of SPA therapy with chlorine-sulphur-bicarbonate mineral water. *Amino Acids* 36 (2):161-165, 2009.
  - [18] Benedetti S, Benvenuti F, Nappi G, Fortunati NA, Marino L, Aureli T, et al. Antioxidative effects of sulfurous mineral water: protection against lipid and protein oxidation. *Eur J Clin Nutr* 63 (1):106-112, 2009.
  - [19] Sukenik S, Flusser D, Codish S, Abu-Shakra M. Balneotherapy at the Dead Sea area for knee osteoarthritis. *Israel Medical Association Journal* 1(2):83-85, 1999.
  - [20] Verhagen A, Bierma-Zeinstra S, Lambeck J, Cardoso JR, de Bie R, Boers M, et al. Balneotherapy for osteoarthritis. A cochrane review. *J Rheumatol* 35(6):1118-1123, 2008.
  - [21] T.E. McAlindon, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 22 (2014) 363e388.
  - [22] Beauchamp R, Bus J, Popp J, Boreiko C, Jelkovich D. A Critical-Review of the Literature on Hydrogen-Sulfide Toxicity. *CRC Crit Rev Toxicol* 13(1):25-97, 1984.
  - [23] Tansy MF, Kendall FM, Fantasia J, Landin WE, Oberly R, Sherman W. Acute and subchronic toxicity studies of rats exposed to vapors of methyl mercaptan and other reduced-sulfur compounds. *J Toxicol Environ Health* 8(1-2):71-88, 1981.

- [24] Poda GA. Hydrogen sulfide can be handled safely. *Arch Environ Health* 12(6):795-800, 1966.
- [25] Whiteman M, Winyard PG. Hydrogen sulfide and inflammation: the good, the bad, the ugly and the promising. *Expert review of clinical pharmacology* 4(1):13-32, 2011.
- [26] Kimura H, Shibuya N, Kimura Y. Hydrogen Sulfide Is a Signaling Molecule and a Cytoprotectant. *Antioxidants & Redox Signaling* 17(1):45-57, 2012.
- [27] Szabo C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature Reviews Drug Discovery* 6(11):917-935, 2007.
- [28] Martelli A, Testai L, Breschi MC, Blandizzi C, Viridis A, Taddei S, et al. Hydrogen sulphide: novel opportunity for drug discovery. *Med Res Rev* 32(6):1093-1130, 2012.
- [29] Kimura H. Hydrogen sulfide: its production and functions. *Exp Physiol* 96(9):833-835, 2011.
- [30] Iciek M, Wlodek L. Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulfur. *Pol J Pharmacol* 53(3):215-225, 2001.
- [31] Li L, Fox B, Keeble J, Salto-Tellez M, Winyard PG, Wood ME, et al. The complex effects of the slow-releasing hydrogen sulfide donor GYY4137 in a model of acute joint inflammation and in human cartilage cells. *J Cell Mol Med* 17(3):365-376, 2013.
- [32] Burguera EF, et al. Effect of H<sub>2</sub>S sources on inflammation and catabolic markers on interleukin 1 beta-stimulated human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 22(7), 1026-1035, 2014.
- [33] Burguera EF et al. Exogenous H<sub>2</sub>S donors show anti-catabolic and anti-inflammatory properties but limited anti-oxidant capability on human articular OA chondrocytes. *Arthritis Rheum* 65: S19, 2013.
- [34] Sondergaard BC, Henriksen K, Wulf H, Oestergaard S, Schurigt U, Brauer R, et al. Relative contribution of matrix metalloprotease and cysteine protease activities to cytokine-stimulated articular cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 14(8):738-748, 2006.
- [35] Karsdal MA, Sumer EU, Wulf H, Madsen SH, Christiansen C, Fosang AJ, et al. Induction of increased cAMP levels in articular chondrocytes blocks matrix metalloproteinase-mediated cartilage degradation, but not aggrecanase-mediated cartilage degradation. *Arthritis Rheum* 56(5):1549-1558, 2007.
- [36] Goldring MB, Otero M, Plumb DA, Dragomir C, Favero M, El Hachem K, et al. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur Cell Mater* 24(21):202-220, 2011.
- [37] Chen WP, Tang JL, Bao JP, Hu PF, Yu C, Shi ZL, et al. Effects of diallyl sulphide in chondrocyte and cartilage in experimental osteoarthritis in rabbit. *Phytother Res* 25(3):351-356, 2011.
- [38] Lee H-, Lee C-, Tsai H-, Salter DM. Inhibition of cyclooxygenase 2 expression by diallyl sulfide on joint inflammation induced by urate crystal and IL-1 beta. *Osteoarthritis and Cartilage* 17(1):91-99, 2009.
- [39] Williams FM, Skinner J, Spector TD, Cassidy A, Clark IM, Davidson RM, et al. Dietary garlic and hip osteoarthritis: evidence of a protective effect and putative mechanism of action. *BMC Musculoskelet Disord* 8(11):280-2474-11-280, 2010.